

Technische Aspekte der Kultivierung osmophiler Hefen

Schügerl, Karl

Veröffentlicht in:
Jahrbuch 2003 der Braunschweigischen
Wissenschaftlichen Gesellschaft, S.52-55



J. Cramer Verlag, Braunschweig

KARL SCHÜGERL, Hannover

Technische Aspekte der Kultivierung osmophiler Hefen

Braunschweig, 13.06.2003*

Einleitung

Eine hohe Zellkonzentration ist in der Biotechnologie die Vorbedingung zu hoher Produktivität. Man versucht daher diese hohe Konzentration schnell zu erreichen, in dem man die Wachstumsrate der Mikroorganismen durch Anwendung hoher Substratkonzentration beschleunigt. Die meisten Mikroorganismen zeigen jedoch bei hohen Konzentrationen der leicht verstoffwechselbaren Substrate eine Katabolit-Repression, die zu einer starken Verminderung der Bildung der erwünschten Produkte führt. Die osmophilen (zuckertoleranten) Hefen zeigen dieses Verhalten nicht. Sie vertragen außerdem noch hohen osmotischen Druck, der bei hohen Substratkonzentrationen vorherrscht. Diese Hefen wurden nach dem zweiten Weltkrieg entdeckt und es dauerte recht lange, bis ihre Produktivität durch Stammverbesserung soweit erhöht wurde, dass sie zur Produktion eingesetzt werden konnten. Die Hefe *Moniliella tomentosa* var *pollinis* war die erste osmophile Hefe, die in der Industrie verwendet wurde. Das Verfahren mit dieser Hefe wurde von uns in Kooperation mit der Industrie erarbeitet. Aufbauend auf unsere Untersuchungen wurde von dieser Firma ein Prozess zur Produktion von Erythrit eingesetzt. Die Produktion erfolgt zur Zeit in einem 500 m³ großen Reaktor.

Anwendung von Zuckeralkoholen

Zuckeralkohole werden heute auf vielen Anwendungsgebieten eingesetzt. Hauptanwendungsgebiete sind die Herstellung von Nahrungsmitteln, Pharmazeutika, Kosmetika, Textilien und Polymeren.

Erythrit, Ribit und Arabit haben einen hohen Marktpreis. Ihre Produktion erschien daher lohnend. Da jedoch der Bedarf an Erythrit am höchsten ist, hat man sich auf seine Produktion konzentriert. Dabei ließ sich das Beiprodukt Ribit ebenfalls auf dem Markt absetzen.

Biologie der Hefe und Biochemie der Zuckeralkoholproduktion

Ethanol wird über Glykolyse, Erythrit und Ribit werden von dieser Hefe über den Pentose-phosphatweg und Glycerin über beide Wege gebildet. Die Regulation des Pentosephosphatweges bei osmophilen Hefen ist bisher unbekannt. Deshalb lassen sich keine Voraussagen über das Verhältnis der Produkte Ribit, Erythrit und Glycerin machen.

* Kurzfassung eines Vortrags gehalten in der Klasse für Mathematik und Naturwissenschaften der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft.

In festen ungerührten Kulturen wächst die Hefe in Pilzform und vermehrt sich durch Arthrosporen. In gut durchmischten Submers-Kulturen wächst die Hefe in hefeartiger Form hervor und vermehrt sich durch Sprossung.

Auswahl des Kultivierungsmediums

Der Anteil der Rohstoffkosten beträgt 60 % der Produktbildungskosten. Daher spielt die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums eine große Rolle. Da unser Industriepartner Maisstärkehersteller war, sollte Maistärke und Maisquellwasser die Grundlage des Kultivierungsmediums bilden. Maisstärke wird enzymatisch zur Glukose abgebaut. Maisquellwasser eignet sich leider nicht gut als Proteinquelle, da die Hefe die Hälfte des Proteins von Maisquellwasser nicht verstoffwechseln kann. Daher wurde neben Glukose als Kohlenstoffquelle Hefeextrakt als Proteinquelle, sowie Harnstoff und Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle verwendet.

Auswahl des Reaktors und der Prozessführung

Die Hefe bildet zahlreiche Zuckeralkohole und Polysaccharide in unterschiedlichen Verhältnissen. Die Zielsetzung war es, die Konzentration und die Ausbeute von Erythrit zu maximieren, d.h. die Bildung anderer Zuckeralkohole und Polysaccharide zu minimieren.

Die Voraussetzung zur Bildung von Erythrit ist die Stickstofflimitierung des Wachstums. Bei Stickstofflimitierung tritt jedoch eine starke Schaumbildung auf, die durch Antischaummittel oder durch mechanischen Schaumzerstörer nicht zu kontrollieren ist. Die hohe Stabilität des Schaumes ist durch die Bildung und Anwesenheit von Polysacchariden bedingt, die zum Glucan Typ gehören. Die Bildung von Polysacchariden ist nicht gekoppelt mit dem Wachstum und der Bildung von Erythrit. Ihre Ausscheidung könnte mit der Zellyse zu tun haben.

Die Voraussetzung zur Bildung von Erythrit und zur Vermeidung der Schaumbildung ist eine genaue Kontrolle der Aufnahme der Stickstoffverbindung, die in einem sehr engen Bereich gehalten werden muss, wie unsere Untersuchungen zeigten.

Bei osmophilen Hefen arbeitet man mit hohen Substratkonzentrationen. Obwohl die Mikroorganismen auf hohe Konzentration der Kohlenstoffquelle nicht so empfindlich reagieren wie gewöhnliche Hefen, will man zu hohe oder zu niedrige lokale Konzentration der Stickstoffquelle im Reaktor vermeiden. Beim Stickstoffüberschuss wird kein Erythrit produziert. Starke Stickstofflimitierung verursacht Schaumbildung und bei Sauerstofflimitierung wird Ethanol gebildet und durch Lyse der Zellen wird die Schaumbildung verstärkt.

In einem kleinen Laborreaktor lässt sich die Konzentration der Stickstoffquelle und des Gelöstsauerstoffs am optimalen Niveau halten, wenn man ihre Konzentration on-line überwacht und ihre Zudosierung kontrolliert. In großen Reaktoren treten lokale Inhomogenitäten auf, in denen die Konzentration der Stickstoffquelle von ihrem optimalen Wert abweicht und Sauerstofflimitierung auftreten kann. Daher ist die Güte der Durchmischung, die durch die Reaktorkonstruktion, eingetragene Leistung, Zugabestelle des Substrates und die Art der Begasung bedingt ist, wichtig.

Die drei Standardreaktoren in der Biotechnologie sind: Rührkessel, Blasensäule und Schlaufenreaktor. In diesen Reaktoren erfolgt die Durchmischung in unterschiedlicher Weise: In Rührkesseln wird die Leistung mit mechanischen Rührern eingetragen. Die lokale Zirkulationsströmung des Kultivierungsmediums wird durch die durch Turbulenz verursachte chaotische Bewegung überlagert. In Blasensäulen gibt es keine gerichtete Strömung. Die chaotische Flüssigkeitsbewegung wird durch die durch Blasen verursachte chaotische Bewegung überlagert. Man kann nicht voraussagen, welche von diesen Reaktoren sich im Industriemaßstab für die Produktion am besten eignet. Daher wurden alle drei Reaktoren: ein 30 l Rührkessel, eine 100 l Blasensäule und ein 100 l Schlaufenreaktor im Laboratorium und 500 l Reaktoren im halbtechnischen Maßstab für die Produktion von Erythrit verwendet.

Diese Reaktoren wurden im Satz- und im Zufütterungsbetrieb eingesetzt. Im Satzbetrieb wird der Reaktor mit dem Kultivierungsmedium gefüllt, beimpft und damit die Reaktion gestartet. Die Konzentration der Zellmasse nimmt als Funktion der Zeit zu und die Konzentration des Substrates (Glukose) und der Stickstoffquelle ab. Während der Wachstumsphase wird kein Erythrit produziert, da die Konzentration der Stickstoffquelle zu hoch ist. Bei Verminderung seiner Konzentration tritt allmählich Stickstofflimitierung auf und die Bildung von Erythrit beginnt. Eine weitere Reduktion seiner Konzentration führt zur Schaumbildung. Der Unterschied zwischen diesen zwei Grenzen ist sehr schmal. Im Satzbetrieb kann dieses schmale Fenster nur sehr kurz aufrechterhalten werden.

Im Zufütterungsbetrieb werden die Kohlenstoffquellen und Stickstoffquellen während der Kultivierung dem Reaktor möglichst so zudosiert, dass die Konzentration der Stickstoffquelle immer im optimalen Bereich liegt.

Wie regelt man die Zufütterung? Da während der Produktionsphase ständig Stickstofflimitierung vorherrschen muss, ist die Konzentration der Stickstoffquelle im Reaktor gleich Null. Die Zudosierung kann daher nicht durch on-line Überwachung der Konzentration der Stickstoffquelle gesteuert werden.

Um eine Lösung zu finden, wurden zahlreiche Versuche unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen und bei Überwachung der wichtigsten Prozessvariablen durchgeführt. Unter anderem wurde der Stickstoffgehalt der Hefe als Funktion der Kultivierungszeit bestimmt. In einem typischen Fall steigt der Stickstoffgehalt der Zelle im Satzbetrieb während der exponentiellen Wachstumsphase von 3% auf 5% und während der Produktionsphase fiel er allmählich auf niedrige Werte ab. Dabei unterschreitet er die kritische Grenze von 2,5 %, unter der die Schaumbildung beginnt. Der Stickstoffgehalt der Zellen soll in einem engen Bereich über 2,5% liegen, wenn man Erythrit ohne Schaumbildung bilden will. Da on-line Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Zellen nicht möglich war, wurde der Bedarf an Stickstoff indirekt ermittelt.

Es besteht eine enge Beziehung zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffaufnahmeraten, die jedoch vom Verhältnis der Kohlenstoff zur Stickstoffquelle im Zufütterungsgemisch abhängt. Es wurde eine empirische Beziehung zwischen diesen Größen für verschiedene Zufütterungsgemische ermittelt. Durch Überwachung der Konzentration der Kohlenstoffquelle (Glukose) mit on-line HPLC wurde die Glucoseaufnahmerate ermittelt und daraus

die Stickstoffaufnahme berechnet. Die Glukose Konzentration wurde konstant gehalten. Da in diesem Fall die Zufütterungsrate von Glukose mit ihrer Aufnahme gleich ist, konnte man aus der Zufütterungsrate von Glukose bei gegebenem Konzentrationsverhältnis von Glukose zur Stickstoffquelle im Zufütterungsgemisch die Aufnahme der Stickstoffquelle direkt bestimmen und daraus den Stickstoffgehalt der Zelle berechnen.

Vergleich der Ergebnisse mit verschiedenen Reaktortypen und mit Satz- und Zufütterungsbetrieb

Die höchste Zellmassenkonzentration wurde im Rührkessel erreicht, da der Leistungseintrag hauptsächlich mit Rührer erfolgt. Bei hoher Drehzahl lässt sich hohe Sauerstoffeintragsrate erzielen. Damit ist die Versorgung der Zellen auch bei hoher Konzentration gesichert.

In Blasensäule und Schlaufenreaktor war die Zellmassenkonzentration erheblich geringer, da der Leistungseintrag hier nur durch Begasung erfolgt, die stark begrenzt ist. Dies lässt nur eine geringere Zellkonzentration zu.

Trotzdem war die Konzentration von Erythrit gleich groß und fast doppelt so hoch im Zufütterungsbetrieb wie im Satzbetrieb in allen drei Reaktoren. Die Ausbeute von Erythrit, bezogen auf eingesetzte Glukose, war allerdings höher in der Blasensäule und im Schlaufenreaktor, da zur Bildung der Zellmasse geringere Glukosemenge benötigt wurde, als im Rührkessel. Die Produktivität war höher mit Zufütterung in allen drei Reaktoren als im Satzbetrieb. In Blasensäule und Schlaufenreaktor war sie höher als im Rührkessel.

Der Unterschied zwischen der Blasensäule und dem Schlaufenreaktor war in 100 l und 500 l Maßstab sehr gering. Über m³-Maßstab erwies sich die Blasensäule besser als der Schlaufenreaktor. Daher wird die Produktion in einem 500 m³ Blasenreaktor durchgeführt.

Versuche mit einem Mutanten

Ein Mutant HAT 101 der Hefe wurde in Blasensäule und im Schlaufenreaktor eingesetzt. Die Leistungsdaten des Mutanten waren recht gut. Allerdings hatte er eine zu hohe Wachstumsrate. Diese führte zu hoher Sauerstoffverbrauchsrate und Sauerstofflimitierung. Als Folge war die Ethanolproduktion, Zellyse und Schaumbildung hoch.

Die Stammverbesserung der Hefe mit Gentechnik führte dann zu wesentlich höherer Ausbeute und Produktivität, sodass die Herstellung von Erythrit mit diesem Verfahren wirtschaftlich wurde.

Ich bedanke mich bei der Fa. CERESTAR, Vilvoorde, Belgium für die Finanzierung der Untersuchungen und bei meinen früheren Mitarbeitern, insbesondere bei Herrn Dr. J. Burscheper, der die wichtigsten Messungen im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt hat, für ihre Mitwirkung.

Prof.Dr.rer.nat, Dr. h.c. Karl Schügerl
Arnumer Kirchstraße 31
D-30966 Hemmingen